



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA  
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

**FRANCISCO JOSÉ CABRAL MESQUITA**

**A ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-113up) COMO MEIO DE LAVAGEM DE  
ESPERMATOZOIDES PARA USO EM TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO HUMANA  
ASSISTIDA**

**FORTALEZA – CEARÁ  
2017**

FRANCISCO JOSÉ CABRAL MESQUITA

A ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-113up) COMO MEIO DE LAVAGEM DE  
ESPERMATOZOIDES PARA USO EM TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO HUMANA  
ASSISTIDA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Clemente de Mello Salgueiro.

Coorientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

FORTALEZA – CEARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Mesquita, Francisco José Cabral.

A água de coco em pó (ACP-113up) como meio de lavagem de espermatozoides para uso em técnicas de reprodução humana assistida [recurso eletrônico] / Francisco José Cabral Mesquita. - 2017.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 55 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, , Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2017.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Ph.D. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro.

Coorientação: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

1. Infertilidade. 2. Espermatozoide. 3. Água de coco. I. Título.

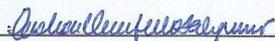
FRANCISCO JOSÉ CABRAL MESQUITA

A ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-113up) COMO MEIO DE LAVAGEM DE  
ESPERMATOZOIDES PARA USO EM TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO HUMANA  
ASSISTIDA

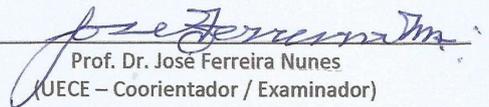
Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado Profissional em Biotecnologia  
em Saúde Humana e Animal da  
Universidade Estadual do Ceará, como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 12 de abril de 2017.

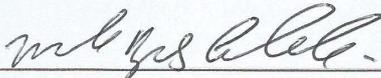
BANCA EXAMINADORA



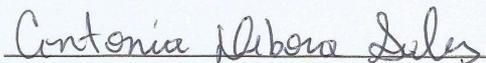
Profa. Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro  
(Unichristus – Orientadora / Presidente)



Prof. Dr. José Ferreira Nunes  
(UECE – Coorientador / Examinador)



Prof. Dr. Marcelo Borges Cavalcante  
(UNIFOR - Examinador)



Profa. Dra. Antonia Debora Sales  
(UECE - Examinadora)

Aos meus pais, Dr. Mesquita e Dona Ana  
Maria. À minha amada esposa, Larissa.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por iluminar os meus caminhos desde os primeiros passos.

Aos meus pais, Dr. Mesquita e D. Ana Maria, principalmente e essencialmente, por todo apoio, amor e dedicação sempre devotados. Amo-as incondicionalmente.

À minha esposa, Larissa, pelo companheirismo e amor demonstrados nos grandes períodos de ausência dedicados ao estudo deste projeto.

Aos professores, Rômulo da Silveira e Rommel Regadas, pela confiança incondicional em mim depositada, por todos os ensinamentos e apoio durante a minha trajetória acadêmica, orientadores desde os primeiros projetos de iniciação científica, residência e mestrado. Sempre tranquilos, sensatos, disponíveis para tudo que pedia. Muito obrigado!

Aos amigos de trajetória, Ivon Teixeira e Everaldo Moura que, juntamente comigo, batalharam para que este projeto se tornasse realidade. Obrigado por estarem sempre presentes, por aconselhar e compartilhar suas experiências profissionais, sempre com ética e profissionalismo.

Aos professores doutores José Ferreira Nunes e Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pela orientação, construção e apoio desta ideia desde o princípio, além da confiança em mim depositada. Muito obrigado.

À empresa ACP Biotecnologia, pelo fornecimento dos meios aqui estudados e pelo suporte técnico.

Ao Programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (MPBiotec), pela realização deste trabalho. À professora Ivelise Brasil, meus sinceros agradecimentos.

À minha coorientadora, Érika Caldas da Silveira, pelas ideias, pela experiência compartilhada e por todos os recursos disponibilizados através da Clínica CEMISE/VIDA.

Às biomédicas da CEMISE/VIDA Valdereis e, em especial à Bárbara Repolho, que foi de suma importância para a realização desse projeto.

A todos aqueles que mesmo sem serem citados expressamente neste momento serão à medida que lembrados, sempre dignos de minha gratidão.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar algum”.

(Frank Clark)

## RESUMO

Modernas técnicas de reprodução assistida têm evoluído dramaticamente o tratamento da infertilidade. Atualmente, uma das mais utilizadas na preparação de espermatozoides para uso em protocolos de reprodução assistida é o *swim-up*. Nela, é empregado comumente como meio de lavagem de espermatozoides o tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline* (PBS) e, para *swim-up*, o *human tubal fluid* (HTF), que apesar de serem soluções estéreis e inertes, não são totalmente isentas de riscos de contaminação, além de provocar modificações, como alterações de morfologia e morfometria nos espermatozoides. O objetivo do estudo foi testar a utilização da água de coco em pó (ACP-113up) como meio de lavagem na preparação de amostras seminais normozoospermicas empregando a técnica do *swim-up*, analisando a quantidade e a qualidade dos parâmetros seminais pré e pós-processamento. Amostras seminais de 50 pacientes foram utilizadas em três grupos experimentais: GC = grupo controle (sêmen fresco), G1 = grupo 1 (lavagem com PBS e *swim-up* com HTF), e G2 = grupo 2 (lavagem com ACP-113up e *swim-up* com HTF). Os parâmetros seminais foram analisados pré e pós-processamento, de acordo com o manual OMS 2010. A concentração dos espermatozoides recuperados no grupo G1 foi igual à do grupo G2, entretanto os dois grupos apresentaram concentrações inferiores ao GC. A motilidade apresentou melhores resultados nos grupos G1 e G2, em relação ao GC. Com relação às alterações morfológicas e aos defeitos primários (inerentes do paciente), não houve diferença entre os tratamentos e o sêmen fresco. Já com relação aos defeitos secundários (resultantes do processamento), pode ser observado que o processamento do sêmen provocou danos, principalmente quanto à cabeça e ao acrossoma. Conclui-se que o uso de ACP-113up como meio de lavagem na preparação de espermatozoides, como alternativa ao padrão, resultou em taxas inferiores de concentração espermática em relação ao sêmen fresco, sem, contudo, comprometer a sua utilização nas técnicas de reprodução humana assistida. A recuperação de espermatozoides com morfologia normal e maior motilidade se mostrou ligeiramente superior com uso de ACP113-up no processo de lavagem em relação ao meio padrão (PBS). Em amostras seminais onde há a necessidade de recuperar espermatozoides com melhor morfologia ou maior motilidade, o uso do ACP-113up seria uma alternativa viável desde que a concentração estivesse normal.

**Palavras-chave:** Infertilidade. Espermatozoide. Água de coco.

## ABSTRACT

Modern assisted reproductive techniques have dramatically evolved the treatment of infertility. Currently, one of the most used in the preparation of spermatozoa for use in assisted reproduction protocols is the swim-up. In it, phosphate-buffered saline (PBS) and, for swim-up, the human tubal fluid (HTF), which although sterile and inert solutions are commonly used as the sperm washing medium, are not totally free of contamination risks, besides causing modifications, such as changes in morphology and morphometry in spermatozoa. The aim of the study was to test the use of powdered coconut water (ACP-113up) as a washing medium in the preparation of normozoospermic seminal samples using the swim-up technique, analyzing the quantity and quality of pre and post-processing. Seminal samples of 50 patients were used in three experimental groups: GC = control group (fresh sperm), G1 = group 1 (wash with PBS and swim up with HTF), and G2 = group 2 (washing with ACP-113up and swim up with HTF). Seminal parameters were analyzed pre- and post-processing according to the WHO manual 2010. The concentration of the spermatozoa recovered in the G1 group was the same as in the G2 group, however the two groups had lower concentrations than the GC. Motility presented better results in groups G1 and G2, in relation to CG. Regarding the morphological alterations and the primary defects (inherent to the patient), there was no difference between treatments and fresh sperm. Regarding the secondary defects (resulting from the processing), it can be observed that the processing of the sperm caused damage, mainly to the head and the acrosome. It is concluded that the use of ACP-113up as a washing medium in the preparation of spermatozoa, as an alternative to the standard, resulted in lower rates of sperm concentration compared to fresh sperm, without compromising its use in assisted human reproduction techniques. Recovery of spermatozoa with normal morphology and greater motility was shown to be slightly higher with use of ACP113-up in the washing process compared to the standard medium (PBS). In seminal samples where there is a need to recover spermatozoa with better morphology or greater motility, the use of ACP-113up would be a viable alternative as long as the concentration was normal.

**Keywords:** Infertility. Spermatozoa. Coconut water.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1 - Valores de referência para análise seminal preconizada pela OMS.....</b>	<b>20</b>
<b>Quadro 2 - Caracterização físico-química da água de coco de frutos com sete meses de idade.....</b>	<b>25</b>
<b>Quadro 3 - Aminoácidos encontrados na composição da água de coco.....</b>	<b>26</b>
<b>Quadro 4 - Composição bioquímica da água de coco em pó (ACP).....</b>	<b>30</b>
<b>Quadro 5 - Estudos realizados com a utilização do meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP).....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Água de coco
ACE	Água de coco estabilizada
ACIN	Água de coco <i>in natura</i>
ACL	Água de coco liofilizada
ACP	Água de coco em pó
C	Cabeça
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Flagelo
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
HTF	<i>Human Tubal Fluid</i>
HSA	Albumina do soro humano
IAA	Ácido 3- indol acético
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PI	Peça intermediária
RHA	Reprodução humana assistida
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SSS	Substituto de soro sintético

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1	INFERTILIDADE MASCULINA.....	15
2.2	ESPERMATOZOIDE HUMANO: MORFOLOGIA E MORFOMETRIA.....	15
2.3	CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E REAÇÃO ACROSSÔMICA.....	17
2.4	COMPOSIÇÃO DO SÊMEN HUMANO.....	18
2.5	AVALIAÇÃO DO SÊMEN HUMANO <i>IN VITRO</i> .....	19
2.6	BIOTECNOLOGIAS REPRODUTIVAS.....	21
2.7	PREPARAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES PARA PROTOCOLOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA.....	22
2.8	MEIOS DE LAVAGEM.....	23
2.9	A ÁGUA DE COCO.....	24
2.10	ESTUDOS REALIZADOS COM A UTILIZAÇÃO DO MEIO DE CONSERVAÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP).....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	33
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	36
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	44
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
	<b>ANEXOS</b> .....	54
	ANEXO A – Comprovante submissão artigo.....	55

## 1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é definida como a incapacidade de conseguir uma gestação após um ano de relações sexuais frequentes sem o uso de anticoncepcionais. (PRACTICE COMMITTEE OF AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2008). A infertilidade tem sido reconhecida como um problema de saúde pública, e com base na população mundial, estima-se que 72,4 milhões de casais são inférteis (BOIVIN *et al.*, 2007). Acomete 15% dos casais em todo o mundo e o fator masculino é, isoladamente, responsável por 20% dos casos e contribui em outros 30 a 40% dos casais (PFEIFER *et al.*, 2015).

As chances de um casal jovem engravidar por ciclo reprodutivo são de, aproximadamente, 20 a 25%. A probabilidade cumulativa de concepção é 60% nos primeiros seis meses, 84% no 1º ano, e 92% no 2º ano (KAMEL, 2010). Um casal, portanto, é considerado infértil quando após um ano de relações sexuais desprotegidas não ocorre a gravidez, sendo recomendada a avaliação do casal após um ano de tentativa de gravidez ou seis meses se a mulher tem mais de 35 anos (NIESCHLAG; LENZI, 2013).

A infertilidade pode ter como causa fatores masculinos ou femininos. Em contraste, com as mulheres, somente um limitado número de homens com infertilidade tem causas potencialmente tratáveis. Quando o tratamento direcionado ao problema masculino, com comprovado benefício, não obtém sucesso, a reprodução assistida pode ser usada como terapia de segunda linha (ESTEVES *et al.*, 2012).

Modernas técnicas de reprodução assistida (inseminação intrauterina - IUI, fertilização *in vitro* - FIV e injeção intracitoplasmática de espermatozoides - ICSI) têm avançado e evoluído dramaticamente o tratamento da infertilidade masculina e feminina. Estes métodos têm o objetivo de remover o plasma seminal/crioprotetores, aumentar a qualidade espermática e, ao mesmo tempo, iniciar a capacitação espermática (TOURNAYE, 2012).

Entretanto, o sucesso dessas técnicas não seria possível sem o concomitante avanço laboratorial na identificação, manipulação e preparação dos espermatozoides. Na preparação para FIV, os métodos usados para separação de espermatozoides móveis de amostras de sêmen incluem *swim-up*, filtração diferencial em lâ de vidro e uso de procedimentos de centrifugação em gradiente de

densidade. De acordo com o método utilizado, existem diferenças na separação de espermatozoides móveis e imóveis. A centrifugação utilizada nestes métodos de lavagem pode danificar os espermatozoides através da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, da peroxidação de membranas espermáticas, causando efeitos negativos na fusão espermatozoide-oócito (MEHTA; SIGMAN, 2014).

Apesar da diminuição significativa encontrada nestes estudos, os valores obtidos ainda são satisfatórios e compatíveis para utilização em inseminação intrauterina e fertilização *in vitro*, demonstrando que o método *swim-up* permite a recuperação de espermatozoides viáveis. Além disso, diversos autores relatam que a técnica de *swim-up* promove a recuperação e seleção dos melhores espermatozoides, já que apenas os mais capacitados se movimentam para a parte superior do tubo (JAMEEL, 2008; NG; LIU; BAKER, 1992).

Neste contexto, a água de coco surge como alternativa para a lavagem seminal. A água de coco destaca-se por ser uma solução isotônica, com características biológicas e físico-químicas ideais, sendo uma solução exclusivamente vegetal, sem a presença de proteínas animais, que tem sido amplamente utilizada em biotecnologias relacionadas à reprodução animal, bem como outros setores biotecnológicos (NUNES *et al.*, 1996).

No presente estudo, foi testada a utilização da água de coco em pó (ACP-113up) como meio de lavagem na preparação de amostras seminais normozoospérmicas empregando a técnica do *swim-up*, analisando a quantidade e a qualidade dos parâmetros seminais pré e pós-processamento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INFERTILIDADE MASCULINA

A infertilidade é a incapacidade de um casal, com vida sexual ativa e sem uso de métodos contraceptivos, obter uma gravidez espontânea em um ano. Aproximadamente 15% dos casais não obtêm a gestação em um ano e procuram tratamento médico para infertilidade. Eventualmente, menos de 5% permanecem involuntariamente sem filhos (OMS, 2010).

O fator masculino é responsável por aproximadamente 30% dos casos de infertilidade e contribui parcialmente em 20 a 30% de casos adicionais. Deste modo, pode-se considerar que o fator masculino está presente em aproximadamente 50 a 60% dos casais inférteis (MILARDI *et al.*, 2012).

A disseminação e padronização das técnicas de reprodução assistida trouxeram novas opções de tratamento ao fator masculino da infertilidade conjugal, principalmente com o surgimento de novas biotecnologias reprodutiva.

### 2.2 ESPERMATOZOIDE HUMANO: MORFOLOGIA E MORFOMETRIA

Em 1679, com o advento do microscópio executado por Von Leeuwenhoek, foi possível o estudo de estrutura e células de características microscópicas como o espermatozoide, inovando a tecnologia de estudo antes utilizada na biologia reprodutiva, denominada de castração, já executada por Aristóteles há 300 a.C. (CUPPS, 1991).

Descobertas acerca da localização e mecanismo de produção de espermatozoides foram sendo pesquisados e elucidados e, em 1841, Von Kolliker observou em seus estudos que o espermatozoide se desenvolvia de células especializadas localizadas nos túbulos seminíferos emaranhados no testículo e um ano mais tarde foram encontrados espermatozoides no muco cervical (CUPPS, 1991; MORAES, 2007).

As células de Sertoli foram descritas por Franz Von Leydig, em 1850, e Enrico Sertoli, em 1865, descreveram as células espermatogênicas de suporte e um ano mais tarde Sims fez o primeiro exame pós coital, sendo as células germinativas finalmente classificadas morfológicamente em 1871 por Von La Vallete e estudos de

Von Ebner, em 1871, e Benda, em 1887, levaram à compreensão ordenada do processo espermatogênico (CUPPS, 1991; MORAES, 2007).

As características e formação ultraestruturais e funcionais dos espermatozoides humanos já são bem conhecidas e são devidamente projetadas para a fertilização. Os espermatozoides humanos são compostos de cabeça oval e subdivididos em cabeça onde está localizado o acrossoma, peça intermediária onde estão localizadas as mitocôndrias, e a cauda que é composta por uma peça principal e outra terminal sendo totalmente envolvido pela membrana plasmática. A pequena região unindo a cabeça à cauda é chamada de colo ou pescoço (MORAES, 2007).

O comprimento do espermatozoide humano gira em torno de 59 a 64  $\mu\text{m}$ , em média de 60  $\mu\text{m}$  e sua cabeça consiste de uma vesícula acrossômica, originária do complexo de Golgi da espermatíde. Os dois terços anteriores da cabeça dos espermatozoides são mais achatados e o terço posterior é arredondado, e separando estas duas regiões há geralmente um anel caudal que corresponde à borda posterior do acrossoma. A cabeça possui um comprimento de 4 a 5  $\mu\text{m}$  e 2,5 a 3,5  $\mu\text{m}$  de largura (BLOOM; FAWCETT, 1986).

A cabeça do espermatozoide humano é tomada quase que exclusivamente por um núcleo, que acompanha o mesmo formato da cabeça, estruturas citoesqueléticas e de uma pequena quantia de citoplasma. O núcleo apresenta grânulos de cromatina condensada de densidade normal e homogêneo, que permite uma diminuição do volume nuclear, protege o DNA (ácido desoxirribonucleico) e evita lesões traumáticas em sua trajetória dentro ou fora do aparelho reprodutor feminino (MORAES, 2007).

Os dois terços anteriores do núcleo estão revertidos por uma organela membranosa chamada acrossoma, formada por duas unidades de membrana que tem no seu interior várias enzimas hidrolíticas como hialuronidase e acrossina (ZANEVELD; SCHUMACHER, 1986).

O colo do espermatozoide é a região mais frágil e mede 1,0 a 1,5  $\mu\text{m}$  de comprimento. É composto por duas estruturas, o centríolo proximal e peça conectiva. A peça intermediária possui um comprimento de 5 a 7  $\mu\text{m}$  e 1,0  $\mu\text{m}$  de largura e compreende de axonema, fibras densas, bainha mitocondrial onde se observa 10 a 15 mitocôndrias de orientação espiralada, porção de citoplasma recoberta pela membrana citoplasmática. A cauda possui aproximadamente 45  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,5  $\mu\text{m}$  de largura afilando na parte terminal. Compreende as

mesmas estruturas da peça intermediária com algumas modificações com o afilamento da cauda (BLOOM; FAWCETT, 1986).

### 2.3 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E REAÇÃO ACROSSÔMICA

O acrossoma é dividido em dois segmentos: a capa acrossomal e a linha ou segmento equatorial. O primeiro corresponde ao acrossoma anterior e segundo, ao acrossoma posterior. No intercurso da reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem e formam vesículas liberando o conteúdo acrossomal. A membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozoide com o oócito (SHERMAN, 1990).

O espermatozoide humano é revestido em sua totalidade pela membrana citoplasmática que é composta por proteínas e uma variedade de lipídios. As proteínas são subdivididas em integrais e periféricas e as moléculas lipídicas, podemos observar os fosfolipídios (glicofosfolípidos e esfingofosfolípidos), glicolípido, gangliosídeos esteroides (colesterol). Os fosfolipídios da membrana estão organizados em forma bilaminar assimétrica sendo que o compartimento superficial da membrana plasmática do espermatozoide difere tanto estruturalmente como funcionalmente (SINGER; NICHOLSON, 1972).

A atividade e integridade funcional da membrana lipoproteica dos espermatozoides são de vital importância para o processo de fertilização, sendo a avaliação da função da membrana pode ser um indicador útil da capacidade de fertilização dos espermatozoides. Estudos identificaram a presença de ativadores de bicarbonato adenilato ciclase (AC), pela constatação de que o processo de capacitação é acompanhado da fosforilação da tirosina localizada em um subconjunto característico de proteínas flagelares (BEARER; FRIEND, 1982, 1982).

Após serem depositados no trato genital feminino, os espermatozoides vão passar pelo processo de capacitação, onde adquirem a habilidade de locomoção. Tem-se definido como capacitação espermática o intervalo de tempo entre a deposição do sêmen no genital feminino durante a cópula natural e a ocorrência da fertilização. Neste processo ocorrem mudanças na membrana plasmática do espermatozoide, aumentando sua afinidade pela zona pelúcida, criando condições para uma possível fertilização (FLESCH; GADELLA, 2000).

Apesar do grande interesse em diferentes componentes moleculares, ainda existem grandes lacunas no conhecimento de como esses diferentes componentes são montados nas complexas estruturas dos espermatozoides, os mecanismos responsáveis pela função dessa célula, e como estes mecanismos são regulados.

## 2.4 COMPOSIÇÃO DO SÊMEN HUMANO

O plasma seminal fornece um meio nutritivo e de proteção para os espermatozoides durante o seu trajeto inicial pelo trato reprodutor feminino. O ambiente normal da vagina é hostil para as células espermáticas, pois é muito ácido devido à produção do ácido láctico, a vagina tem uma característica viscosa, e vigiada por células do sistema imunológico. Os componentes do plasma seminal tentam compensar este ambiente hostil, composto de aminas como putrescina, espermina, espermidina e cadaverina que são responsáveis pelo odor do sêmen. Estas alcalinas neutralizam o ambiente ácido do canal vaginal e protegem o DNA do espermatozoide da desnaturação ácida (MORAES, 2007).

O sêmen humano é composto de uma mistura de vários componentes produzidos por glândulas diferentes. Estes componentes são misturados de forma incompleta durante a ejaculação e, portanto, a ejaculação inicial não é uma mistura inteiramente homogênea (OWEN; KATZ, 2005).

A primeira porção do ejaculado constitui cerca de 5% do mesmo e é composta pela grande maioria dos espermatozoides epididimais, onde as concentrações de L-carnitina e de alfa-glucosidase presentes nesta substância são indicadores de função epididimal (OMS, 1999). Estas porções contem também secreções da glândula de *Cowper* e glândulas *Littre* como galactose, muco e ácido siálico (OWEN; KATZ, 2005).

A segunda porção deriva da próstata e contribui com aproximadamente 15-30% do sêmen. A próstata é a principal fonte de fosfatase ácida, ácido cítrico, inositol, cálcio, zinco, magnésio, fibrinolisinase, antígeno específico da próstata e enzimas proteolíticas encontrada no ejaculado (OWEN; KATZ, 2005). Seguem as ampolas pequenas e, finalmente, secreções das vesículas seminais, que contribuem com a maior parte do ejaculado (65-75%) (COFFEY, 1995). O produto derivado das vesículas seminais é rico em frutose, ácido ascórbico, prostaglandinas, aminoácidos,

citrato, enzimas, flavinas, fosforilcolina e proteínas. Uma pequena porção da frutose presente no ejaculado tem origem ampola do canal deferente (OWEN; KATZ, 2005).

A maioria das proteínas encontradas no sêmen tem a sua origem na vesícula seminal, entretanto a albumina é principalmente produzida na próstata. Uma revisão de literatura indicou que a albumina corresponde a um terço das proteínas contidas no sêmen. A frutose, por sua vez, é uma importante fonte de energia do espermatozoide e a sua concentração pode mudar o resultado da frutólise, que é a fonte primária de ácido láctico no sêmen e está envolvida em complexos proteicos particularmente a coagulação seminal (OWEN; KATZ, 2005).

O processo de coagulação e liquefação é acompanhado por alterações bioquímicas na composição seminal. Se espermatozoides estiverem presentes na amostra, podem influenciar a mensuração dos componentes do plasma através da ligação de seus componentes nos mesmos, bem como a atividade metabólica espermática e consequente troca de fluidos do espermatozoide para o plasma resultantes da frutólise, glicólise e excreção de resíduos metabólicos (OWEN; KATZ, 2005).

O sêmen humano tem uma capacidade tampão muito alta, superando a maioria de outros fluidos corporais. O sêmen mantém o pH quase neutro no ambiente ácido vaginal, proporcionando aos espermatozoides a oportunidade de entrar no ambiente (pH) neutro do muco cervical (OWEN; KATZ, 2005).

## 2.5 AVALIAÇÃO DO SÊMEN HUMANO *IN VITRO*

O fator masculino separadamente é responsável por 20% da infertilidade conjugal, e 30-40% conjugado com outros fatores. Os fatores de infertilidade conjugal, se estão presentes, são quase sempre definidos por um resultado de análise seminal anormal. Os clínicos geralmente dependem dos resultados de análise de sêmen para a avaliação da fertilidade masculina, apesar destas apresentarem resultados bastante variáveis entre diferentes coletas (MILARDI *et al.*, 2012).

A análise seminal, portanto, é considerada um dos primeiros passos na avaliação de infertilidade masculina. Os parâmetros individuais e coletivos continuam a ser utilizados para determinar métodos para tratar a infertilidade quando

constatado o fator masculino e quais das potenciais causas são reversíveis para as opções de tratamento em Reprodução Humana Assistida (RHA) (PENN *et al.*, 2011).

São necessários valores de referência padrão para norteamento de parâmetros de normalidade na análise seminal, pois é uma análise inteiramente técnica – dependente e um dos primeiros passos no encaminhamento para especialistas, investigação das causas subjacentes, e determinação de opções de tratamento. A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010) estabeleceu recomendações específicas para padronização de parâmetros espermáticos, com base em parâmetros de um grande grupo de homens férteis com intervalos de confiança definidos (PENN, 2011). Os valores definidos pela OMS não podem ser considerados como valores de referência real, porém são valores recomendados como níveis aceitáveis (Quadro 1).

**Quadro 1 - Valores de referencia para análise seminal preconizada pela OMS**

<b>Fase Analítica: Análise Macroscópica</b>	<b>Valores de Referência</b>
pH	≥ 7,2
Odor	<i>Suis Generis</i>
Cor	Branco – acinzentado
Tempo de liquefação	Até 60 minutos
Tempo de duração da coagulação	Até 60 minutos
Liquefação	Secundária
Aspecto após liquefação	Homogêneo
Viscosidade	Normal: Filância de até 2 cm
Volume	≥1,5 ml
<b>Fase Analítica: Análise Microscópica</b>	<b>Valores de Referência</b>
Concentração/ml	≥ 15 milhões/ml
Concentração total	≥ 39 milhões/ejaculado
Motilidade Tipo A + B (motilidade progressiva)	A+B+C≥40% ou A+B≥32%
Motilidade Tipo C (motilidade não progressiva)	
Motilidade Tipo D (imóveis)	

Fonte: OMS (2010).

A razão para esta indefinição é em parte de que esses valores podem variar entre regiões, devido a influências ambientais, sociais e ocupacionais características de cada região, bem como características individuais de desenvolvimento, educação, classe socioeconômica, estilo de vida, saúde e experiência reprodutiva e talvez o mais importante, que são os procedimentos de

recrutamento, preparação, acondicionamento e processamento das amostras analisadas (BONDE, 2010; OMS, 2010).

As análises de concentração, motilidade e morfologia espermática são consideradas por muitos autores como importante ferramenta na quantificação de qualidade de um ejaculado, sendo a determinação da porcentagem de espermatozoides móveis, o teste mais utilizado para prever a qualidade seminal e a morfologia um parâmetro fundamental para predição de técnicas de RHA (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

A morfologia espermática é considerada um dos mais importantes parâmetros seminais, sendo o melhor indicador da fertilidade masculina (COETZEE; KRUGE; LOMBARD, 1998). Dentre os vários sistemas de classificação morfológica, destaca-se o critério estrito de Kruger (MENKEVELD; KRUGER, 1992).

Essa técnica é considerada um dos indicadores da qualidade e viabilidade dos espermatozoides e, conseqüentemente, sua capacidade de fertilização. Este método utiliza a análise morfométrica para classificar o espermatozoide em normal ou anormal, além de identificar a localização da anormalidade (COETZEE; KRUGE; LOMBARD, 1998; MENKEVELD; KRUGER, 1992). Por este critério, o espermatozoide considerado normal deve possuir cabeça com formato oval e superfície regular, além de peça intermediária e cauda sem alterações.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010), todas as formas limítrofes devem ser consideradas anormais e a morfologia de Kruger maior ou igual a 4%.

## 2.6 BIOTECNOLOGIAS REPRODUTIVAS

O uso das biotecnologias reprodutivas tem como objetivo a utilização de conhecimentos sobre os processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos, com o objetivo de resolução de problemas atuais e a criação de produtos de utilidade. O desenvolvimento da biotecnologia na reprodução humana medicamente assistida tem permitido definir novas estratégias no sentido de desenvolver o conhecimento nesta área, bem como disponibilizar novas possibilidades de diagnóstico e tratamento da infertilidade (ALMEIDA, 2005).

Atualmente são utilizadas diversas técnicas como a inseminação IIU, FIV, ICSI e criobiologia da reprodução humana (criopreservação de embriões,

espermatozoides e tecido ovariano). As técnicas aplicadas à infertilidade masculina são frequentemente utilizadas aos pacientes que por alguma condição patológica não produzem espermatozoides (azoospermia) ou produzem espermatozoides anormais (teratozoospermia) ou em pequeno número (oligozoospermia) ou, ainda, espermatozoides não devidamente ativos (astenozoospermia) (ALMEIDA, 2005).

## 2.7 PREPARAÇÃO DE ESPERMATOZOIDEOS PARA PROTOCOLOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Uma das técnicas mais utilizadas na preparação de espermatozoides para uso em protocolos de reprodução assistida é o *swim-up*. Tal procedimento utiliza uma dupla lavagem seguida de centrifugação e foi primeiro descrita e realizada por Lopes *et al.* (1998).

Nesta técnica, o líquido seminal é dividido em duas partes, sendo uma diluída em meio de Ham (*Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA*) contendo 10% de substituto de soro sintético (SSS) (*Irvine Scientific, Irvine, CA, USA*) e depois centrifugada a 220 g durante 10 min. Após isso, o sobrenadante é transferido para outro tubo, onde o sedimento é ressuspensado em mais 2 ml de meio de Ham com 10% de SSS. O sobrenadante e o sedimento são novamente centrifugados a 220 g durante 10 min. e, após isto, o novo sobrenadante é rejeitado.

Os *pellets* são combinados e ressuspensos em 0,5 ml de meio de Ham com SSS a 10%. Coloca-se esta suspensão suavemente sob 1 ml de meio de Ham com SSS a 10%. O tubo é inclinado e incubado durante 1 h a 37 °C numa incubadora de CO<sub>2</sub> a 5%. A fração de esperma aquosa é então fixada em paraformaldeído a 4% para posterior determinação da fragmentação do DNA.

A técnica de *swim-up* também pode ser realizada diretamente sem centrifugação. A amostra de sêmen, 0,10-0,15 ml, é colocada suavemente sob 0,3 ml de meio de Ham com SSS a 10% e incubada durante 1 h a 37 °C numa incubadora de CO<sub>2</sub> a 5%. A porção aquosa é então fixada em paraformaldeído a 4%, como na técnica anterior.

## 2.8 MEIOS DE LAVAGEM

Há diversos tipos de meios de lavagem disponíveis no mercado, entretanto, nenhum deles é totalmente isento de riscos de contaminação, além de provocarem modificações, como alterações de morfologia e morfometria nos espermatozoides. Dentre todos, destaca-se o tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline* (PBS).

Trata-se de uma solução tampão comumente utilizada em bioquímica. É uma solução salina, contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio e, em algumas formulações, cloreto de potássio e fosfato de potássio.

Os chamados tampões ácido-base, têm como finalidade manter um valor de pH praticamente constante, quando adicionados a diferentes meios. A concentração salina presente no PBS procura igualar-se à do corpo humano.

O PBS possui muitas aplicações, pois é isotônico e não é tóxico em relação às células. Ele pode também ser utilizado para diluir diferentes substâncias, ou como uma solução para limpeza celular. Para garantir uma prolongada armazenagem a seco, de biomoléculas imobilizadas, como proteínas e soluções enzimáticas, o PBS é usado como um diluente biomolecular, já que pode manter água em torno das biomoléculas imobilizadas em uma superfície sólida. Este fino filme de água formado, previne a desnaturação das biomoléculas e as mudanças conformacionais (SAKKAS *et al.*, 2000).

Tampões carbonato podem ser também usados com a mesma finalidade, mas com menos eficácia. O PBS puro, pode ser usado como um espectro de referência, quando é determinada a absorção de proteínas por elipsometria.

O uso de aditivos pode modificar a funcionalidade de um tampão PBS. Por exemplo, o PBS com EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilenodiamino tetra-acético) é usado para desalojar células que estejam aderidas ou agregadas em determinados sistemas. Os metais divalentes, como o zinco, não podem ser adicionados em misturas contendo PBS, pois ocorrem precipitações. Neste caso, devemos lançar de outros tipos de sistemas tampão (SAKKAS *et al.*, 2000).

## 2.9 A ÁGUA DE COCO

A espécie *Cocos nucifera* L. é da família Arecaceae, subfamília Cocosidea, família Palmea (coqueiro). É composta por algumas variedades, entre as quais, as mais importantes, do ponto de vista agrônomo, socioeconômico e agroindustrial são: *Typica* (variável Gigante) e *Nana* (variável Anã). Árvore de porte alto, monocotiledônea de países tropicais que teve a sua origem e cultivo na costa e ilhas da zona tropical. Pode alcançar uma altura de aproximadamente 30 m e viver em torno de 90 anos (BASTOS *et al.*, 2008; DUARTE; COELHO; LEITE, 2002).

Constitui-se de uma das mais importantes das culturas perenes, capaz de gerar um sistema autossustentável de exploração, como ocorre em vários países, principalmente no continente asiático, pois sua estabilidade de produção ocorre entre 12 a 15 anos de idade e produz cocos continuamente por cerca de 70 anos, 12 a 13 vezes por ano (ARAGÃO, 2002). No Brasil, o coqueiro está presente em 280 mil hectares, com aproximadamente 1,92 milhões de frutos produzidos.

O líquido endospermico do coco, popularmente conhecido como água de coco, possui várias propriedades nutricionais e terapêuticas. É encontrado no coco pouco antes da fase de maturação. Considerada uma solução natural, estéril e ligeiramente ácida, apresentando um valor de pH na faixa de 4.0 a 5.6, que oscila de acordo com a idade do fruto, variedade e grau de maturação (CAMPOS *et al.*, 1996; CHUMBIMUNI-TORRES; KUBOTA, 2006).

Com aproximadamente seis a oito meses de idade o coco contém em torno de 400 ml de água, aproximadamente 25% do peso do fruto. A água de coco contém fatores de crescimento, proteínas, sais, alcoóis, carboidratos, vitaminas, gorduras neutras e minerais. A composição básica da água de coco possui eletrólitos diversos que promovem pressão osmótica, pH e densidade similar à observada no sangue, que pode ser usada na reposição dos eletrólitos eliminados pelo suor como sódio, potássio, magnésio e cálcio. Por ser isenta de pirógenos e não causar hemólise tanto *in vivo* quanto *in vitro*, pode ser usada também como infusão intravenosa em quadros que necessitem reposição de carboidratos (ARAGÃO, 2001; FERNANDES *et al.*, 2000).

Os carboidratos contidos na água de coco de frutos frescos são predominantemente frutose e glicose (reduzores), que com o avanço do estágio de maturação são transformados em sacarose (não-reduzidor) (ARAGÃO, 2001).

Os produtos químicos pertencentes ao coco despertam o interesse da indústria e comércio, pois são essencialmente um potencial aditivo alimentício que age como antioxidante natural. Esses produtos conferem o aroma à água de coco e são os alcoóis, cetonas, lactonas, aldeídos e ésteres, todos com cadeia curta de carbono, enquanto que o sabor tem como responsável o éster n-propiletanoato. (FONSECA *et al.*, 2008). No quadro 2 abaixo pode-se observar várias substâncias presentes na composição físico-química do coco.

**Quadro 2 - Caracterização físico-química da água de coco de frutos com sete meses de idade**

<b>Conteúdo</b>	<b>Quantidade</b>
Sacarose (mg/100ml)	280,00
Glicose (mg/100ml)	2378,00
Frutose (mg/100ml)	2400,00
P (mg/100g)	7,40
Ca (mg/100g)	17,10
Na (mg/100g)	7,05
Mg (mg/100g)	4,77
Mn (mg/100g)	0,52
Fe (mg/100g)	0,04
K (mg/100g)	156,86
Acidez (% v/p)	1,11
pH	4,91
Sólidos Totais (g/100g)	5,84
Brix	5
Vitamina C (g/100g)	1,20
Glicídios Totais (mg/100g)	3,46
Proteínas (mg/100g)	370,00
Valor Calórico (cal/100g)	27,51

Fonte: Rosa e Abreu (2000).

Os principais aminoácidos encontrados na água obtida em frutos secos são a alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ácido glutamânico e serina, que corresponde a 75% dos aminoácidos livres (Quadro 3).

**Quadro 3 - Aminoácidos encontrados na composição da água de coco**

<b>Aminoácidos</b>	<b>Concentração (g/ml)</b>
Aspártico	5,4
Glutâmico	78,7
Serina	65,8
Glicina	13,9
Asparagina	10,4
Treonina	26,3
Alanina	177,1
Glutamina	13,4
Histidina	Traços
Lisina	22,5
Arginina	16,8
Prolina	21,6
Valina	15,1
Leucina	31,7
Fenilalamina	10,2
Tirosina	3,1
$\gamma$ -aminobutírico	168,8
Hidroxiprolina	Traços
Homoserina	5,2
Metionina	Traços
<b>Total</b>	<b>685,0</b>

Fonte: Marques (1976).

Além das funções relacionadas com a planta, verificou-se que algumas citocininas e alguns de seus derivados poderiam ser utilizados em aplicações médicas, como a supressão de crescimento de tumores em mamíferos, prevenção de formação de coágulos no sangue e retardo no envelhecimento do fibroblasto humano (GE *et al.*, 2006).

Na Índia, foram isoladas e identificadas substâncias como citocininas endógenas e a presença de zeatina ribosídeo e giberelinas, além do ácido 3-indol acético (IAA), do grupo das auxinas, sendo essa uma substância com atividade hormonal estimuladora do crescimento dos vegetais e que possui ação sobre o metabolismo dos espermatozoides (NUNES, 1998).

A água de coco tem sido amplamente utilizada em biotecnologias relacionadas à reprodução animal bem como outros setores biotecnológicos. Como alternativa de diluente pobre em fosfolipídios, a água de coco apresentou excelente comportamento na preservação da viabilidade espermática e fertilidade, aumentando a vida útil e a motilidade dos espermatozoides (NUNES *et al.*, 1996).

Em virtude dessa potencialidade, ela foi testada como diluente para sêmen de diversas espécies em diferentes formas: (a) *in natura* (ACIN), constituída por 50% de água de coco filtrada + 25% de água destilada + 25% de solução de citrato de sódio a 5% (TONIOLLI; MESQUITA, CAVALCANTE, 1998); (b) estabilizada (ACE), que é a ACIN envazada, passada por um processo de esterilização por ultrafiltração, através de membranas de Millipore (ARAGÃO, 2002) e mantida em refrigeração; (c) liofilizada (ACL), em que o produto é congelado e a água é retirada por sublimação; (d) sob forma de gel (ACG; SALLES, 1989); (e) em pó (ACP), obtida por meio da desidratação a alto vácuo, método que produz um pó com menos de 5% de umidade (SALGUEIRO *et al.*, 2007).

A utilização da água de coco como diluente seminal e posterior utilização em técnicas de reprodução animal assistida, como inseminações artificiais em diferentes espécies, dentre elas, caprinos (ARAÚJO, 1990; FREITAS, 1988; RODRIGUES *et al.*, 1994; SALLES, 1989; TONIOLLI, 1989a), ovinos (CRUZ, 1994; FREITAS, 1992; SOUSA *et al.*, 1994), suínos (TONIOLLI, 1989b; TONIOLLI, MESQUITA, 1990), caninos (CARDOSO; SILVA; SILVA, 2006; MONTEZUMA Jr.; VIANA NETO; NUNES, 1994; UCHOA, 2004; UCHOA; CARDOSO; SILVA, 2002), peixes de água doce (FARIAS; NUNES; CARVALHO, 1999), galos (BLESBOIS; SOUSA; GRASSEAU, 1996), capotes (SOUZA; OLIVEIRA; 1996) e abelhas (ALMEIDA; SOARES, 2002).

Com relação a estudos da água de coco na reprodução humana assistida, foram realizados estudos no Hospital Breteanu em Tours (França), em 1995, com indivíduos oligozoospermicos que serviram como doadores de sêmen. O estudo consistia na incubação do sêmen a 37 °C após diluição em diferentes meios com diferentes doses de IAA. Foram observados o movimento do flagelo, bem como a velocidade do espermatozoide em um determinado tempo e foram obtidos valores superiores para todas as doses de IAA diluído em água de coco em relação ao diluente padrão (NUNES; COMBARNOUS, 1995).

A água de coco *in natura* proveniente de frutos com idade de seis meses (variedade verde da praia ou anão maduro) apresenta uma osmolaridade em torno de 500 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O e um pH entre 4,5 e 5,0. No entanto, a utilização da água de coco como diluente se depara com algumas dificuldades de ordem prática, tais como a disponibilidade de frutos com características ideais e a impossibilidade de armazenamento do produto (UCHOA, 2004). Os métodos de conservação devem

objetivar a inibição da atividade enzimática e a garantia da qualidade microbiológica após a abertura do fruto, observando-se a manutenção e, o máximo possível, das características sensoriais originais (CABRAL; PENHA; MATTA, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2005).

A aplicação de tecnologias de processamento e conservação da água de coco viabiliza o comércio desse produto e promove o aproveitamento da fruta (PINHEIRO *et al.*, 2005). Encerrada num invólucro pesado, onera seu uso em regiões afastadas dos cultivares em função do custo de transporte. As tentativas de minorar essa dificuldade se mostraram incipientes, dada sua perecibilidade, alterando rapidamente suas propriedades nutrientes. Os envases, como forma de conservação, levaram, até o momento, a alterações nas suas propriedades, com perdas físico-químicas, organolépticas e biológicas. Embora algumas sejam conservadas comercialmente de forma aceitável, os conservantes respondem por alterações importantes, influenciando delicados mecanismos bioquímicos e fisiológicos presentes na água de coco *in natura* (NUNES; SALGUEIRO, 2006).

Por fim, dentre outros fatores, o perfil nutricional da água de coco sofre variações significativas de acordo com os estádios de maturação do fruto (VIGLIAR; SDEPANIAN; FAGUNDES-NETO, 2006), a variedade da espécie cultivada (JACKSON *et al.*, 2004) e a composição do solo onde a planta é cultivada (KHAN; MUTI; KHAN, 2003). Até mesmo o índice de poluição do solo e do ambiente incide sobre sua composição (PETROIANU *et al.*, 2004). Assim, a difusão do uso da água de coco está limitada, em primeiro lugar, à inexistência de padronização de insumo tão importante. Sua condição lábil tem, inclusive, dificultado os esforços de inúmeros pesquisadores, muitos deles ligados à industrialização, de obter na prateleira, a água de coco *in natura*, sob forma estável e duradoura (NEVES *et al.*, 2005).

Desde 1997, iniciou-se um estudo que levou à padronização do fruto que seria o ideal para a utilização em processos biotecnológicos. Uma vez selecionado o fruto ideal, buscou-se a estabilização da água de coco, fato logrado no início de 2002. Salgueiro *et al.* (2002) desenvolveram um produto à base de água de coco, padronizado na forma de pó, permitindo a conservação das suas características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se disponham do fruto, podendo representar uma alternativa para a difusão de várias biotecnologias.

Tal fato propiciou a padronização dos meios de conservação até então em estudo, não só para sêmen como para outros tipos celulares. Esses meios de

conservação devem levar em conta as características de pH, osmolaridade e composição que possam influenciar diretamente a capacidade de manter as células viáveis após certo tempo. Em relação a pH e osmolaridade, quanto mais próxima às condições fisiológicas (300 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O; pH 7,0), melhor a capacidade do meio para preservar a vitalidade das células (MOREIRA-NETO *et al.*, 2009).

Já que as amostras são diretamente secas e transformadas em pó, as reações são inibidas pela mudança de fase e, portanto, mantêm inalterada todas as suas qualidades. Os cálculos de rendimento permitem restituir, quando de sua reconstituição em água destilada, os parâmetros originais do líquido endospermico exigidos na manutenção de suas propriedades (NUNES *et al.*, 2006).

O produto básico (líquido endospermico do coco), em sua forma processada, confere estabilidade e longevidade de prateleira, sem problemas de acondicionamento, e supera toda e qualquer tecnologia de conservação, uma vez que mantém as propriedades inerentes do produto original. A uniformidade do produto, obtida mediante rigoroso controle de processamento, em condições específicas, leva à manutenção dos valores agregados do endosperma líquido do coco, conforme visto no Quadro 4 (NUNES; SALGUEIRO, 2006).

**Quadro 4 - Composição bioquímica da água de coco em pó (ACP)**

<b>ACP (água de coco em pó) por 100g</b>	
<b>Caloriais (kcal)</b>	<b>378</b>
<b>Caloriais (kJ)</b>	<b>1585</b>
Calorias de Carboidratos (kcal)	372
Calorias de Lipídios (kcal)	3
Calorias de Proteínas (kcal)	4
<b>Carboidrato, por diferença (g)</b>	<b>93,00</b>
Frutose (g)	50,02
Glicose (g)	34,97
Sacarose (g)	3,00
<b>Proteína (g)</b>	<b>0,90</b>
<b>Gorduras totais (g)</b>	<b>0,300</b>
<b>Gorduras saturadas (g)</b>	<b>0,000</b>
<b>Fibra, total alimentar (g)</b>	<b>4,30</b>
Fibra Alimentar Insolúvel (g)	4,10
Fibra Alimentar Solúvel (g)	0,20
Acidez total (ml de NaOH 1 N)	0,2 (Ác. Acético)
Umidade (g)	3,00
Cinzas (g)	1,30
Sólidos Totais (g)	97,01
<b>MINERAIS</b>	
Sódio, Na (mg)	105,000
Cálcio, Ca (mg)	39,000
Ferro, Fe (mg)	0,300
Fósforo, P (mg)	45,200
Magnésio, Mg (mg)	25,000
Manganês, Mn (mg)	1,100
Potássio, K (mg)	250,000
<b>VITAMINAS</b>	
Vitamina B1 (mg), tiamina	0,17
Vitamina B3 (mg), niacina (ácido nicotínico e vitamina PP)	0,12
Vitamina B5 (mg), ácido pantotênico	6,51
Vitamina B12 (mcg), cobalamina	0,22
Ácido Fólico (mcg)	312,00
Vitamina C (mg), ácido ascórbico	26,80
Vitamina D (mcg), calciferol	1,50
Biotina	8,03
<b>AMINOÁCIDOS</b>	
Ácido Aspártico (mg)	0,700000
Ácido Glutâmico (mg)	172,000000
Alanina (mg)	38,600000
Arginina (mg)	126,000000
Cistina (mg)	14,800000
Fenilalanina (mg)	38,000000
Glicina (mg)	36,400000
Glutamina (mg)	172,000000
Histidina (mg)	17,800000
<b>Isoleucina (mg)</b>	<b>29,300000</b>
<b>Leucina (mg)</b>	<b>54,200000</b>
Lisina (mg)	33,100000
Metionina (mg)	14,000000

Prolina (mg)	32,000000
Serina (mg)	39,000000
Tirosina (mg)	24,000000
Treonina (mg)	28,200000
Triptofano (mg)	8,400000
<b>Valina (mg)</b>	<b>48,000000</b>
Osmolaridade (mOsm/Kg H <sub>2</sub> O; 10g em 100 ml)	210
Grau de saturação em água g/ml	0,8

Fonte: ACP Biotecnologia (2017)

## 2.10 ESTUDOS REALIZADOS COM A UTILIZAÇÃO DO MEIO DE CONSERVAÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP)

Diversos estudos utilizando a ACP têm sido publicados na literatura (Quadro 5).

**Quadro 5 - Estudos realizados com a utilização do meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP)**

REFERÊNCIA	ESTUDO REALIZADO
Cardoso et al. (2005)	Criopreservação de sêmen canino em ACP-106 para posterior inseminação artificial
Sobral et al. (2005)	Meio de conservação ACP-201 de vírus em vacinas aviárias por via ocular
Cardoso et al. (2006)	Meio de conservação ACP-201 para vacinas vivas contra vírus de Newcastle em pombos domésticos ( <i>Columba livia</i> ) criados em cativeiro
Oliveira et al. (2007)	Efeito da re-diluição pós-descongelamento sobre a cinética e morfologia de espermatozoides caprinos congelados em a ACP-101 ou TRIS
Rondon et al. (2008)	Estudo <i>in vitro</i> do ACP-108 como meio de conservação de sêmen refrigerado de capotes ( <i>Numida meleagris</i> )
Silva et al. (2008)	Meio de criopreservação ACP-117 para sêmen de gatos e inseminação artificial intravaginal
Cavalcante et al. (2008)	Estudo comparativo entre ACP-102c e TRIS na criopreservação do sêmen de ovinos
Silva et al. (2009)	ACP-318 como meio de maturação de oócitos caninos
Pessoa et al. (2009)	Estudo da cinética de espermatozoides de Pirapitinga ( <i>Piaractus branchyomus</i> ) criopreservados em ACP-104 e outros meios
Melo et al. (2010)	Meio de conservação ACP-101 adicionado de <i>Aloe vera</i> na refrigeração do sêmen caprino a 4 °C
Lima et al. (2010)	Meio de conservação de folículos preantrais caninos com meio ACP-base
Viveiros et al. (2010)	Meio ACP-104 na criopreservação de sêmen de peixe de água doce (Curimba)
Lavor et al. (2011)	Avaliação do meio de conservação ACP-108 de sêmen de galos ( <i>Gallus gallus</i> ) e capotes ( <i>Numida meleagris</i> )
Uchoa et al. (2012)	Avaliação do ACP-106c como meio de diluição de sêmen canino
Silva et al. (2013)	Avaliação do meio de conservação ACP-116c de sêmen de caititu ( <i>Pecari tajacu</i> )
Leão et al. (2015)	Avaliação do meio de conservação ACP-118 de sêmen de macacos ( <i>Sapajus apela</i> )

Fonte: Próprio autor.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a eficiência de solução água de coco em pó (ACP-113up) como meio de lavagem na preparação de amostras seminais normozoospérmicas comparado ao meio convencional padrão-ouro no mercado – Tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline* (PBS), empregando a técnica do *swim-up*, analisando a quantidade e a qualidade dos parâmetros seminais pré e pós-processamento.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar a eficiência do meio ACP-113up com o meio convencional PBS quanto às características gerais dos espermatozoides em protocolo de lavagem de sêmen humano, avaliando os efeitos sobre a morfologia e morfometria espermática.

## 4 METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unichristus, sob nº 51301415.8.0000.5049. Nos meses de janeiro e fevereiro de 2016 amostras normozoospérmicas de 50 voluntários foram colhidas em uma Clínica de Reprodução Humana, através de masturbação, após um período de abstinência que variou entre dois e cinco dias.

As amostras foram incubadas e mantidas aquecidas a 37 °C até sua liquefação. Em seguida, realizou-se Análise Seminal Padrão conforme a 5ª edição do Manual de Processamento do Sêmen Humano da Organização Mundial da Saúde (2010).

Utilizou-se os seguintes meios:

- PBS (*Phosphate Buffered Saline Solution*; Irvine Scientific, USA);
- HTF (*Human Tubal Fluid*; Irvine Scientific, USA); e
- ACP-113up (meio à base de água de coco em pó; ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará; pH 7,34; 300 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O).

A avaliação seminal foi realizada em dois momentos: (1) Lavagem seminal; e (2) *Swim-up*.

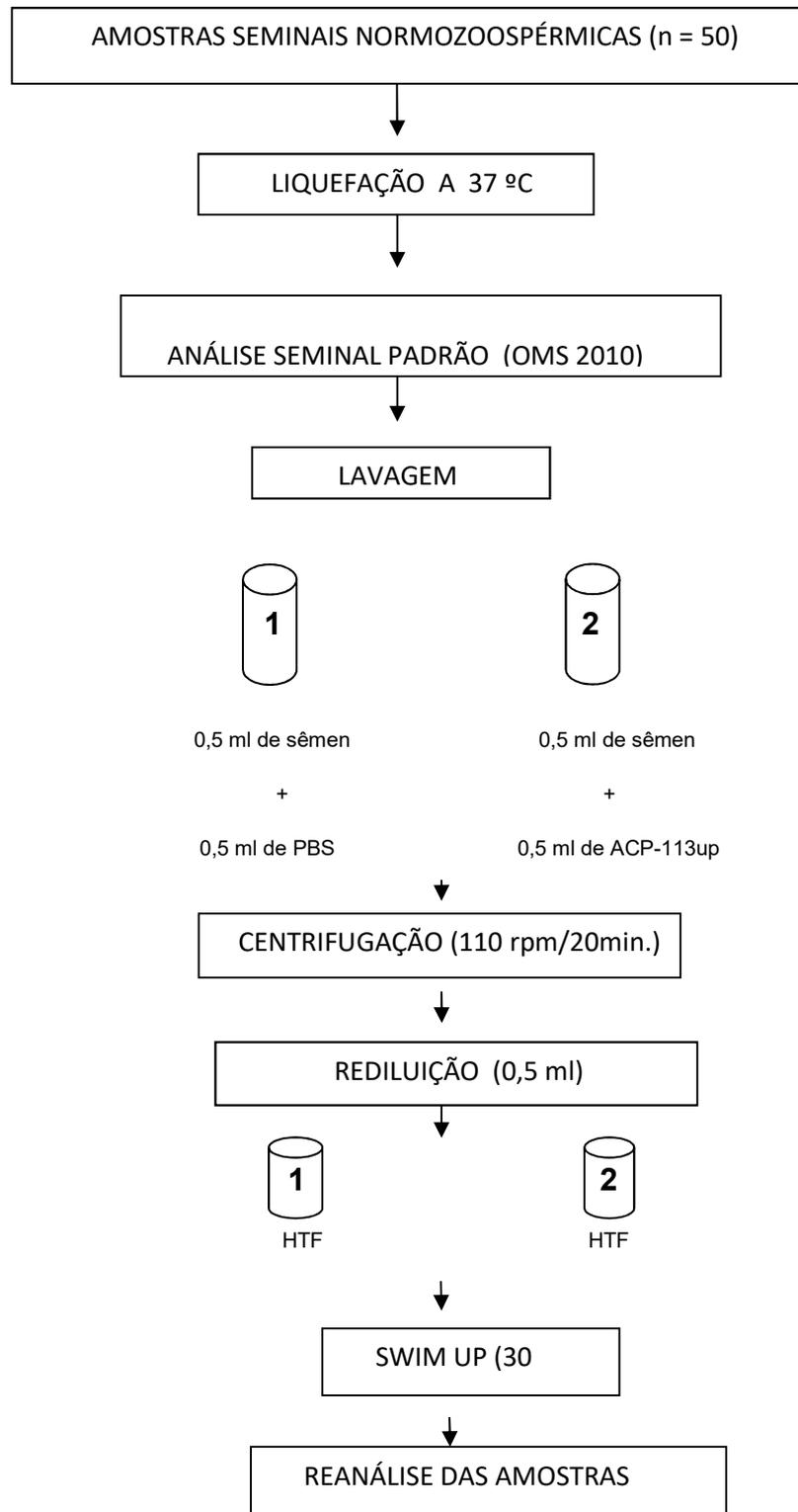
### Lavagem seminal:

Cada amostra liquefeita foi dividida em três frações iguais de 0,5 ml e dispensadas em tubos de ensaio e adicionadas de 0,5 ml de PBS (tubo 1) e 0,5 ml de ACP-113up (tubos 2 e 3). Os tubos foram então centrifugados a 110 rpm por 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado restando em cada tubo apenas o sedimento (pellet).

### Swim-up:

Ao sedimento (pellet) de cada tubo foram adicionados 0,5 ml de HTF (tubos 1 e 2) e 0,5 ml de ACP-113up (tubo 3). Os tubos foram inclinados a 45°, aquecidos a 37 °C e, após 60 min., o sobrenadante foi aspirado e foi procedida à análise da concentração e motilidade dos espermatozoides que nadavam para a

parte de cima do meio de cultura, além da morfologia pelo critério estrito de Kruger (KRUGER *et al.*, 1987).



No estudo, foram formados os seguintes Grupos Experimentais:

GC = Grupo Controle (sêmen fresco);

G1 = Grupo 1 (padrão ouro; lavagem com PBS e *swim up* com HTF);

G2 = Grupo 2 (lavagem com ACP-113up e *swim up* com HTF).

#### Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *software* estatístico SPSS v23. Os parâmetros descritivos das análises seminais foram expressos a partir de suas medianas. As diferenças entre os grupos em relação aos parâmetros do sêmen fresco foram avaliadas pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que as variáveis têm distribuição não normal. Foram realizados então os testes de Mann-Whitney para avaliação da significância estatística das diferenças encontradas. Foi considerado significativo valores de  $p$  menores que 0,05.

## 5 RESULTADOS

Dentre os cinquenta participantes da pesquisa, a idade média foi de 29,5 anos. Trinta (62,5%) se declararam pardos. Vinte e seis (52%) eram solteiros. O índice de massa corpórea (IMC) médio dos voluntários foi de 25,56 kg/m<sup>2</sup>.

Dentre os hábitos pesquisados, 31 (62%) declararam realizar algum tipo de atividade física regularmente e apenas 4 (8%) eram tabagistas. O consumo recreativo de álcool, entretanto, foi admitido por 30 (60%) dos participantes.

Dentre as variáveis relacionadas à coleta, destacaram-se a perda de conteúdo seminal no momento da coleta, relatada por 6 (12%) dos envolvidos e o tempo médio de abstinência de três dias, variando de um a sete dias.

O volume médio de sêmen coletado foi de 3 ml. Todas as amostras avaliadas apresentaram coloração característica (branca). A viscosidade e a consistência foram consideradas normais em 68% (n=34) e 64% (n=32) das amostras, respectivamente.

As análises do sobrenadante do *swim-up* foram comparadas grupo a grupo (Tab. 1). Os parâmetros analisados foram: concentração ([sptz]/ml); motilidade total (motilidade A + motilidade B; %); e morfologia total (segundo critério de Kruger). As alterações na morfologia foram classificadas em alterações de cabeça (%), de acrossoma (%), e de três segmentos do espermatozoide: acrossoma (A), cabeça (C), peça intermediária (PI), e flagelo (F) ou em todos os segmentos (A +C+PI+F). Foi utilizado o teste estatístico de Mann-Whitney para avaliação de variáveis não paramétricas.

**Tabela 1 - Mediana de parâmetros espermáticos de amostras lavadas com PBS ou ACP-113up, centrifugadas e rediluídas com HTF ou ACP-113up e submetidas à técnica de *swim up***

Parâmetros espermáticos	GC (sêmen fresco)	G1 (PBS + HTF)	G2 (ACP + HTF)
[sptz]/ml	64,00	25,50 <sup>c</sup>	25,00 <sup>c</sup>
Mot A+B (%)	68,35	85,85 <sup>c</sup>	84,95 <sup>c</sup>
Sptz Morf Nor (%)	2,00	3,00 <sup>a</sup>	3,00
Alt Cab (%)	14,00	19,00 <sup>a</sup>	18,00
Alt Acros (%)	0,00	2,50 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
Sptz def (C+A+PI / C+A+F / A+PI+F / C+PI+F)	27,00	26,50	27,00
Sptz def (C+A+PI+F)	13,00	11,00	11,00

Fonte: Próprio autor.

GC = grupo controle (sêmen fresco); G1 = grupo 1 (lavagem com PBS + *swim up* com HTF); G2 = grupo 2 (lavagem com ACP-113up + *swim-up* com HTF). [sptz]/ml = concentração espermática por mililitro; Mot A + B = porcentagem de espermatozoides com motilidade A + B, ou seja, com trajetória retilínea; Sptz Morf Nor = porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais; Alt Cab = porcentagem de alterações de cabeça totais; Alt Acros = porcentagem de alterações de acrossoma; Sptz def = espermatozoides com defeito; C = cabeça; A = acrossoma; PI = peça intermediária; F = flagelo. <sup>a</sup> p < 0,05; <sup>b</sup> p < 0,01; <sup>c</sup> p < 0,001.

A análise dos resultados das técnicas lavagens revelou que a concentração dos espermatozoides recuperados no grupo G1 (lavagem PBS + *swim up* HTF) foi igual à do grupo G2 (lavagem ACP + *swim-up* HTF). Entretanto, os dois grupos (G1 e G2) apresentaram concentrações inferiores ao grupo controle (sêmen fresco).

A motilidade, por sua vez, apresentou melhores resultados, nos grupos G1 e G2, em relação tanto ao grupo GC.

Tanto em relação às alterações morfológicas, quanto aos defeitos primários (inerentes ao paciente), não houve diferença entre os tratamentos e o sêmen fresco. Já com relação aos defeitos secundários (resultantes dos processos de preparação), pode ser observado que o processamento do sêmen provocou danos, principalmente quanto à cabeça e ao acrossoma.

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente, a infertilidade conjugal é considerada um problema de saúde pública, podendo afetar um em cada seis casais. Dentre as causas, o fator masculino pode representar até metade dos casos. A infertilidade masculina é normalmente diagnosticada pelas alterações nos parâmetros seminais, entretanto, em alguns casos, ela ocorre mesmos com parâmetros considerados normais. Diversas causas de infertilidade masculina são conhecidas, infelizmente nem todas podem ser identificadas e tratadas (PFEIFER *et al.*, 2008; 2015). Em muitos casos, onde um tratamento específico não resulta em sucesso, as técnicas de reprodução assistida surgem como opção de tratamento (TOURNAYE, 2012).

Com o observado aumento da demanda por técnicas de reprodução assistida, tem havido uma constante melhora nos procedimentos rotineiramente empregados nos laboratórios de fertilização, principalmente no preparo dos espermatozoides (VOLPES, 2016).

A despeito da existência de diversas técnicas, não há consenso sobre qual delas é a mais adequada, quando se consideram os custos e o tempo de execução (KIM *et al.*, 2015). Dentre os protocolos de processamento de sêmen mais comumente utilizados, destacam-se o *swim-up* e o gradiente de densidade.

A técnica de processamento de sêmen ideal envolveria a remoção do plasma seminal de forma rápida e eficiente, separando-o dos espermatozoides. Embora o plasma seminal proteja os espermatozoides de condições deletérias como estresse oxidativo, ele contém fatores, como espermatozoides velhos, leucócitos, células epiteliais, debris e contaminação microbial, que inibem a habilidade dos espermatozoides na fertilização e reduzem a indução da sua capacitação (ALLAMENENII *et al.*, 2005). Por isso, não se recomenda a utilização do sêmen *in natura* em técnicas de reprodução assistida.

O *swim-up* é a técnica mais usada em laboratórios de FIV, sendo preferida nas amostras de sêmen que têm um bom número de espermatozoides normais (normozoospermia). Nesta técnica, os espermatozoides são selecionados pela sua motilidade e capacidade de nadar para fora do plasma seminal (NATALI, 2011). No preparo dos espermatozoides é necessário a utilização de meios de lavagem e meios de cultura para manter a viabilidade das células.

Enquanto há diversos tipos de meios de cultura, como os meios suplementados com albumina de soro humano (HSA) ou soro substituto sintético (SSS) ou o *Human Tubal Fluid- Ivine Scientific* (EUA). No processo de lavagem, entretanto, há poucas opções além do PBS.

Apesar das opções disponíveis no mercado, não há, entretanto, um meio de lavagem totalmente eficiente e isento de riscos de contaminação. Além do mais, a otimização do processo de fertilização *in vitro* continua em evolução, com foco na utilização de meios de cultura que possam obter maiores taxas de fecundação, renegando ao segundo plano os meios de lavagem.

Neste contexto, a água de coco surge como excelente alternativa como meio de lavagem para fertilização *in vitro*.

A água de coco é o líquido do endosperma encontrado dentro da cavidade do coco e, de acordo com pesquisas, corresponde a 25% do peso do fruto e sua composição básica é de 95,5% de água, 4% de carboidratos, 0,1% de gordura, 0,02% de cálcio, 0,01% de fósforo, 0,5% de ferro, além de aminoácidos, vitamina C, vitaminas do complexo B e sais minerais e osmolaridade de 419 mOsmol/L (VIGLIAR; SDEPANIAN; FAGUNDES-NETO, 2006). Seu pH varia de acordo com a idade do fruto, sendo que, quando da idade de cinco meses, o pH encontra-se em torno de 4,7 a 4,8, elevando-se acima de 5,0 até o final do crescimento do fruto (ARAGÃO; ISBERNER; CRUZ, 2001).

O uso da água de coco *in natura* apresenta limitações, como a impossibilidade de se estocar o fruto por longos períodos, sendo sua utilização limitada às regiões onde esse fruto é encontrado (CARDOSO; SILVA; SILVA, 2005).

A água de coco em pó (ACP), obtida por meio da técnica de *spray dry*, método que produz um pó seco a partir de um líquido mediante rápida secagem com um gás quente, foi desenvolvida com o intuito de simplificar a utilização da água de coco como diluente. Após sua ressuspensão, apresenta características bioquímicas muito similares às aquelas encontradas no fruto *in natura*. Além disso, a ACP pode ser facilmente armazenada e enviada para regiões onde o coco não é encontrado (CARDOSO *et al.*, 2005).

Nosso estudo revelou que a água de coco em pó preparada para uso como meio de lavagem de amostras seminais humanas (ACP 113up), com correção do pH e da osmolaridade, foi semelhante ao PBS, quando se analisa a motilidade e concentração total e ambas foram superiores ao grupo controle (sêmen fresco).

Quando se separam as alterações morfológicas em defeitos primários e secundários, observam-se nítidas diferenças. Nos defeitos primários, não foram encontradas diferenças entre os meios PBS e ACP em relação ao sêmen fresco. Já nos defeitos secundários, observa-se que em ambos os meios, houve um aumento de alterações de cabeça e acrossoma estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Quando comparamos os meios de lavagem, PBS versus ACP, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles em nenhum dos critérios analisados, o que provaria a não inferioridade do ACP-113up em relação ao PBS.

A fertilidade masculina é reconhecida como um importante componente para capacidade de concepção do casal. A análise dos parâmetros seminais (volume, pH, concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides) é a ferramenta que se utiliza para avaliar a fertilidade masculina (COETZEE; KRUGE; LOMBARD, 1998)

A morfologia dos espermatozoides tem sido considerada como o parâmetro que mais consistentemente se relaciona com a fertilidade dos homens. Atualmente existem dois sistemas de avaliação da morfologia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) na 5ª edição de seu manual considera normal a amostra seminal que tem mais 30% de espermatozoides normais. O outro sistema de classificação, o critério estrito de Kruger, considera normal a amostra com mais de 14% de espermatozoides que obedecem a estes critérios (COETZEE; KRUGE; LOMBARD, 1998; MENKVELD, 2010; OMS, 2010).

Aproximadamente 4% dos homens inférteis têm teratozoospermia como o único parâmetro seminal alterado. Neste cenário preconiza-se o tratamento desse homem com técnicas de reprodução assistida (fertilização *in vitro* ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide). Entretanto, o impacto da teratozoospermia no resultado dessas técnicas é controverso (HOTALING, 2011).

Figueiredo *et al.* (1996) avaliaram 66 casais que se submeteram a 77 ciclos consecutivos de fertilização *in vitro* devido à teratozoospermia (concentração e motilidade normais). Os casais foram distribuídos em três grupos de acordo com a porcentagem de espermatozoides normais (G1 < 4%; 14% < G2 > 4%; e G3 > 14%). O resultado do estudo mostrou que não houve diferença na fertilização dos oócitos no grupo com teratozoospermia severa (G1) quando comparado com os outros grupos.

Kruger *et al.* (1987) pesquisaram a morfologia espermática como critério para prever resultado de gravidez. O estudo avaliou homens com amostras seminais que tinham concentração e motilidade normais. Os casais foram divididos em dois grupos, de acordo com a morfologia: G1 < 14% de formas normais, e G2 > 14%. Os casais foram tratados com fertilização *in vitro*. O resultado mostrou que o índice de fertilização do G1 foi de 49,4%, enquanto que no G2, foi de 88,3%

O impacto da morfologia espermática sobre o resultado da fertilização dos oócitos e gravidez quando se emprega a técnica da fertilização *in vitro* clássica (FIV clássica) é controverso, e alguns autores recomendam, nesta situação, que esses casais sejam tratados com injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (HOTALING, 2011).

Universalmente, o sistema de classificação mais comum utilizado para a morfologia do esperma é o critério da OMS (OMS, 2010). O limiar de espermatozoides com morfologia normal abaixo da recomendada para FIV varia amplamente na literatura de 4% a 50% [FIGUEIREDO *et al.* (1996); KRUGER *et al.* (1987); VIGLIAR; SDEPANIAN; FAGUNDES-NETO, 2006]. No entanto, a implicação da morfologia do esperma sozinho para a escolha e o resultado da IUI é controversa. Muitos estudos retrospectivos e prospectivos mostraram que a morfologia do espermatozoide isoladamente, antes ou após a preparação, não ajudou a prever os resultados da IUI (BARROS; TONIOLLI, 2011; HOTALING, 2011; LUNDIN; SODERLUND; HAMBERGER, 1997).

A avaliação do número de espermatozoides móveis em conjunto com a morfologia espermática pode representar uma importante deliberação para a tomada de decisão clínica. Para uma taxa de espermatozoides morfológica normal < 30%, a taxa de prenhez clínica foi de 4,62% quando o número de espermatozoides móveis foi <  $5 \times 10^6$ , e 9,45% quando o número de espermatozoides móveis foi >  $5 \times 10^6$  ( $p < 0,05$ ). Como esperado, teratospermia grave é geralmente associada à oligospermia, o que torna inviável a obtenção de um número de espermatozoides móveis >  $5 \times 10^6$ . Se este nível de motilidade de espermatozoides ainda não pode ser alcançado, é melhor recomendar FIV (HENKEL; SCHILL, 2003).

Em estudo realizado para avaliar a relação entre morfologia espermática e índice de fertilização, gravidez e abortamento quando se utiliza FIV clássica e ICSI, LUNDIN; SODERLUND; HAMBERGER, 1997 examinaram dados de 622 casais que se submeteram a 465 ciclos de FIV clássica e 157 de ICSI. As

amostras seminais foram separadas em três grupos de acordo com a porcentagem de formas normais usando o critério estrito de Kruger (amostras com >14%, entre 5 e 14% e <5%). Os resultados da ICSI mostraram que não houve diferença na fertilização ou gravidez mesmo quando a morfologia era o único parâmetro alterado.

A recuperação de espermatozoides morfologicamente normais é clinicamente relevante, pois a morfologia espermática é um dos parâmetros de seleção mais importantes e, possivelmente, a variável mais consistente relacionada com o sucesso da fertilização tanto *in vitro* (FIV) quanto *in vivo* (AUGER, 2010; MENKEVELD; KRUGER, 1992). A importância desse parâmetro é reforçada por estudos que mostraram que seu poder preditivo é independente de outros parâmetros e que é o parâmetro mais estável do sêmen. Um estudo retrospectivo da avaliação morfológica e funcional espermática, incluindo testes de integridade de DNA, revelou que a morfologia pelo critério estrito é o principal preditor para a ICSI e juntamente com a concentração de espermatozoides móveis são os principais preditores para os casos de FIV (FRANKEN; AVARI; PALSHEKAR, 2008; MENKEVELD; KRUGER, 1992).

Em uma revisão sistemática e meta-análise, Hotaling *et al.* (2011) avaliaram a relação entre teratozoospermia isolada e gravidez clínica após fertilização *in vitro* com ou sem ICSI e concluíram que a teratozoospermia não estava associada ao sucesso em gravidez clínica, seja usando FIV clássica ou ICSI.

Apesar da controvérsia sobre o impacto da teratozoospermia na fertilização e gravidez de casais tratados com técnicas de reprodução assistida, a utilização de ACP na preparação de espermatozoides neste cenário poderia beneficiá-los considerando o aspecto mais importante a integridade morfológica do espermatozoide que não só interfere na fertilidade, mas especialmente na qualidade embrionária reduzindo os índices de abortamentos.

A técnica biotecnológica de preparação ideal é aquela que conduz à obtenção do maior número de espermatozoides morfologicamente normais e de boa motilidade num reduzido volume de meio de cultura, apesar de muitas pesquisas realizadas na área de conservação de células espermáticas em diversas espécies incluindo humanos, esta técnica ainda deve ser melhorada, para a obtenção da recuperação pós descongelamento de um número cada vez maior de células morfologicamente e funcionalmente viáveis (ALMEIDA, 2005).

Em vista destes resultados, a IUI utilizada para o tratamento da infertilidade do fator masculino parece ter poucas chances de sucesso quando a mulher tem mais de 35 anos de idade, o número de espermatozoides inseminados é  $< 5 \times 10^6$ , ou a morfologia normal do esperma é  $< 30\%$ . Nesse contexto, o processo de lavagem com ACP-113up parece melhorar, ou pelo menos equiparar, os resultados de motilidade e de morfologia, em relação ao PBS.

Em resumo, o meio à base de água de coco em pó surge como uma excelente alternativa para lavagem de sêmen, já que é uma solução isotônica apresentando características biológicas e físico-químicas ideais. Além disso, a água de coco é um componente exclusivamente vegetal, sem proteínas de origem animal, reduzindo assim a taxa de indução de reação imunológica, além de proporcionar menores custos para realização das técnicas utilizadas em serviços de reprodução humana.

## 7 CONCLUSÃO

O uso de água de coco como meio de lavagem na preparação de espermatozoides como alternativa ao padrão resultou em taxas inferiores de concentração espermática em relação ao sêmen fresco sem, contudo, comprometer a sua utilização nas técnicas de reprodução humana assistida.

A recuperação de espermatozoides com morfologia normal e maior motilidade se mostrou ligeiramente superior com uso de ACP113-up no processo de lavagem em relação ao meio padrão (PBS).

Em amostras seminais onde há a necessidade de recuperar espermatozoides com melhor morfologia ou maior motilidade, o uso de água de coco seria uma alternativa viável desde que a concentração estivesse normal.

Como os índices de fertilização dos óvulos estão mais relacionados com a morfologia dos espermatozoides, estudos avaliando-se as taxas de fertilização e gravidez utilizando-se os gametas masculinos preparados com água de coco em pó são necessários.

## REFERÊNCIAS

- ALLAMENENII, S. S. *et al.* Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v. 7, n. 1, p. 86-92, 2005. doi: 10.1111/j.1745-7262.2005.00008.x
- ALMEIDA, R.; SOARES, A. E. E. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; HYMENOPTERA: APOIDEA). **Interciencia**, v. 27, n. 6, p. 317-21, 2002.
- ALMEIDA, V. M. Biotecnologia em reprodução humana assistida. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 21, p. 505-8, 2005.
- ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. O. **Água-de-coco**. Aracaju: Embrapa CPATC/ Tabuleiros Costeiros, 2001. (Série Documentos 24).
- ARAGÃO, W.M. (Ed.) **Coco: pós-colheita**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 76 p. il.; color (Frutas do Brasil, 29), 2002.
- ARAÚJO, A. A. **Utilização da água de coco “in natura” com adição de gema de ovo como diluidor do sêmen caprino**. 1990. 33 f. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1990.
- AUGER, J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? **Asian Journal of Andrology**, v. 12, p. 36-46, 2010.
- BARROS T. B. *et al.* Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 400-7. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n4/pag%20400-407.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2017.
- BASTOS, H. I. G. *et al.* The effect of a natural solution of coconut water on the macrophage cultures: a morphological analysis. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 12, p. 1437-43, 2008.
- BEARER, E. L.; FRIEND, D. S. Modifications of anionic lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. **Journal Cell Biology**, v. 92, p. 604-15, 1982.
- BLESBOIS, E.; SOUSA, F.M.; GRASSEAU, I. Effects of 3-indole acetic acid (IAA) on the storage at 4 °C of fowl sperm. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS, 20., 1996, New Delhi. **Proceedings...** New Delhi: WPC, 1996.
- BLOOM, W.; FAWCETT, D. W. Male Reproductive System. In: **A Textbook of Histology**, 1986. p. 796-849.

BOIVIN, J. *et al.* International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1506-12, 2007.

BONDE, J. P. E. Semen analysis from an epidemiologic perspective. **Asian Journal of Andrology**, p. 91-4, 2010.

CABRAL, L. M. C.; PENHA, E. M.; MATTA, V. M. **Água de coco verde refrigerada**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 34.

CAMPOS, C.F. *et al.* Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of Green coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20 p. 487-500, 1996.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 257-62, 2005. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v2n4/Use%20of%20the%20powdered.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 384-91, 2006.

CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; KUBOTA, L. T. Simultaneous determination of calcium and potassium in coconut water by a flow-injection method with tubular potentiometric sensors. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 225-30, 2006.

COETZEE, K.; KRUGE, T. F.; LOMBARD, C. J. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 73-82, 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622414>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

COFFEY, D. What is the prostate and what is its function? In: ROBAIRE, B; PRYOR, J.L.; TRASLER, J. M. (eds). **Handbook of Andrology**. Lawrence, Kans: Allen Press Inc; 1995. p. 21-4.

CRUZ, J. F. **Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido à temperatura de +4 °C por um período de 48 horas diluído em frações ativas da água de coco**. 1994. 56 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1994.

CUPPS, P. T. Spermatogenesis. In: **Reproduction in domestic animals**, 4 th., San Diego, California. Chapter 5, p. 174-220, 1991.

DUARTE, A. C. P.; COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F. Identification of peroxidase and tyrosinase in Green coconut water. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 3, n. 5, p. 266-70. 2002.

ESTEVEES, S. C. *et al.* What every gynecologist should know about male infertility: an update. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 286, p. 217-29, 2012. doi: 10.1007/s00404-012-2274-x

FARIAS, J. O.; NUNES, J. F.; CARVALHO, M. A. M. Avaliação "in vitro" e "in vivo" do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER) conservado à temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, p. 44-58, 1999.

FERNANDES, J. C. B. *et al.* Simultaneous determination of chloride and potassium in carbohydrate electrolyte beverages using an array of ion-selective electrodes controlled by a microcomputer. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 349-54, 2000.

FIGUEIREDO, H. *et al.* Isolated teratozoospermia and in vitro fertilization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 13, p. 64-8, 1996. doi: 10.1007/BF02068872

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FONSECA, A. M. *et al.* Coconut water (*Cocos nucifera* L.) – A new biocatalyst system for organic synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. doi: 10.1016/j.molcatb.2008.06.022. 2008.

FRANKEN, D. R.; AVARI, K.; PALSHEKAR, N. Morphology training is compulsory to ensure relevant clinical results. **Andrologia**, v. 40, p.377-380, 2008.

FREITAS, J. V. F. **Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina coriônica (ECG) inseminadas artificialmente**. 1988. 34 f. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

FREITAS, J. V. F. **Parâmetros andrológicos e avaliação "in vitro" do sêmen de ovinos deslançados criados na região litorânea do Nordeste brasileiro em estação seca e chuvosa**. 1992. 73 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

GE, L. *et al.* Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1133, p. 322-31, 2006.

HENKEL, R. R.; SCHILL, W-B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 108, 2003.

HOTALING, J. M. *et al.* The relationship between isolated teratozoospermia and clinical pregnancy after in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. **Fertility & Sterility**, v. 95, p. 1141-5, 2011. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.029

JACKSON, J. C. *et al.* Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 9, n. 84, p. 1049-1052, 2004.

JAMEEL, T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 58, n. 2, p. 71-4, 2008.

KAMEL, R. M. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 21-8, 2010. doi: 10.1186/1477-7827-8-21

KHAN, M. N.; MUTI, U. R.; KHAN, K. W. A study of chemical composition of *Cocos nucifera* L. (coconut) water and its usefulness as rehydration fluid. **Pakistan Journal of Botany**, v. 35, n. 5, p. 925-30, 2003.

KIM, E. K. *et al.* Comparison of the effect of different media on the clinical outcomes of the density-gradient centrifugation/swim-up and swim-up methods. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 42, p. 22-9, 2015. doi: 10.5653/term.2015.42.1.22

KRUGER, T. F. *et al.* New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. **Urology**, v. 30, p. 248-51, 1987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3629768>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

LOPES, S. *et al.* Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. **Fertility & Sterility**, v. 69, n. 3, p. 528-32, 1998.

LUNDIN, K.; SODERLUND, B.; HAMBERGER, L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection program. **Human Reproduction**, v. 12, n. 12, p. 2676-81, 1997.

LUNDIN, K.; SÖDERLUND, B.; HAMBERGER, L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection program. **Human Reproduction**, v. 12, p. 2676-81, 1997. Disponível em: <[https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content\\_public/Journal/humrep/12/12/10.1093\\_humrep\\_12.12.2676/1/122676.pdf?Expires=1491500431&Signature=gONxQB6Ve6AuwLXIJFZPLS7JeIJTCxq2D8cOReNwA6VIY~g5alOmogg86T1AwKnZOPpn7I6KXwx854d0koRg~gZoCi~cbEsbLnixZ5UdwHXkY3r~ewjc6GFPUXUCeohCyc2euV0jldO6br-ig6HguK2rRxJM5YPEJUhhc-gwbvH79q0czqvYTCwcJorxajuYQoK2Pdf4o-VnO0HFjq3f2IHVCNRYsOFLke1iRNZ53JPtVF6iGOMif2WyEbKJ9Fx4silOcGiRLtFcgKLIZN-5uDhaZp7HTjJByggfGCSfrqa1-mjVyHqdA189-ugcAZm6hvxDOwGUYfiLakThtXNHuuA\\_\\_&Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPAVW3Q](https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/humrep/12/12/10.1093_humrep_12.12.2676/1/122676.pdf?Expires=1491500431&Signature=gONxQB6Ve6AuwLXIJFZPLS7JeIJTCxq2D8cOReNwA6VIY~g5alOmogg86T1AwKnZOPpn7I6KXwx854d0koRg~gZoCi~cbEsbLnixZ5UdwHXkY3r~ewjc6GFPUXUCeohCyc2euV0jldO6br-ig6HguK2rRxJM5YPEJUhhc-gwbvH79q0czqvYTCwcJorxajuYQoK2Pdf4o-VnO0HFjq3f2IHVCNRYsOFLke1iRNZ53JPtVF6iGOMif2WyEbKJ9Fx4silOcGiRLtFcgKLIZN-5uDhaZp7HTjJByggfGCSfrqa1-mjVyHqdA189-ugcAZm6hvxDOwGUYfiLakThtXNHuuA__&Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPAVW3Q)>. Acesso em: 02 abr. 2017.

MAGALHAES, M. P. *et al.* Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 25, n. 1, p. 72-7, 2005.

MEHTA, A.; SIGMAN, M. Identification and preparation of sperm for ART. **Urologic Clinics of North America**, v. 41, p. 169-80, 2014. doi: 10.1016/j.ucl.2013.08.005

MENKVELD, R.; KRUGER, T.F. Sperm morphology – predictive value? **Fertility and Sterility**, v. 67, p. 942, 1992.

MILARDI, D. *et al.* Clinical study male fertility and reduction in semen parameters: a single tertiary-care center experience. **International Journal of Endocrinology**, 2012.

MONTEZUMA Jr., P. A.; VIANA NETO, R.; NUNES, J. F. Utilização da água de coco “in natura”, com adição de gema de ovo, como diluente de congelamento do sêmen canino, em pallets de 0,5 ml. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Olinda, PE. **Anais...** Olinda-PE: CFMV, p.535, 1994.

MORAES, G. E. S. Aparelho Reprodutor Masculino. In: **Espermocitologia: espermocitograma em critério estrito**. 2. ed., Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2007. cap. 1, p. 13-58.

MOREIRA-NETO, J. J. S. *et al.* Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 9, p. 827-30, 2009.

NATALI, I. Sperm preparation techniques for artificial insemination - Comparison of sperm washing, swim up, and density gradient centrifugation methods. In: MANAFI, M. **Artificial insemination in farm animals**, cap. 7 (Intech), 2011. doi: 10.5772/17026.

NG, F. L.; LIU, D. Y.; BAKER, H. W. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. **Human Reproduction**, v. 7, n. 2, p. 261-6, 1992.

NIESCHLAG, E.; LENZI, A. The conventional management of male infertility. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 123, p. S31-S35, 2013. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.09.001

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, 1., 1995, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UECE, p. 57-63, 1995.

NUNES, J. F. *et al.* Utilização da água de coco e suas frações ativas na conservação in vitro e avaliação in vivo do sêmen na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 2, p. 34, 1996.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, n. 2, p. 109-112. 1998.

NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n. 43, supl, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen**. 5. ed. WHO Press: Geneva, 2010. Disponível em: <[http://www.cnrha.msssi.gob.es/bioetica/pdf/semen\\_humano.pdf](http://www.cnrha.msssi.gob.es/bioetica/pdf/semen_humano.pdf)>. Acesso em: 02 abr. 2017.

OWEN, D. H.; KATZ, D. F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, 2005.

PENN *et al.* National semen analysis reference range reporting: adherence to the 1999 World Health Organization guidelines 10 years later. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 7, 2011.

PETROIANU, G. A. *et al.* Green coconut water for intravenous use: trace and minor element content. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 17, n. 4, p. 273-82, 2004.

PFEIFER, S. *et al.* Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. **Fertility and Sterility**, v. 90, p. 560, 2008.

PFEIFER, S. *et al.* Diagnostic evaluation of the infertile male; a committee opinion. **Fertility and Sterility**, v. 103, p. 44-50 2015, doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.019

PINHEIRO, H. A. *et al.* Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, v. 96, n. 1, p. 101-8, 2005.

RODRIGUES, A. P. R. *et al.* Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como diluidores do sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Olinda-PE. **Anais...** Olinda: CFMV, p. 540, 1994.

SAKKAS, D. *et al.* The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. **Human Reproduction**, v. 15, n. 5, p. 1112-6, 2000.

SALGUEIRO, C. C. M. *et al.* Inseminação artificial de ovelhas com sêmen diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102) ou TRIS, resfriado e mantido a 4°C por 24 horas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Curitiba. **Anais ...** Curitiba: CBRA, 2007. p.149.

SALLES, M. G. F. **Água de coco (Cocos nucifera L.) in natura e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor do sêmen caprino.** 1989. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.

SHERMAN J. Cryopreservation of human semen. In: CRC Press BR (ed.) **Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility.** Florida, USA. 1990.

SINGER, S. Y.; NICHOLSON, G. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-31, 1972.

SOUSA, N. M. *et al.* Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidor do sêmen ovino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23. 1994, Olinda-PE. **Anais...** Olinda: CFMV, p. 583, 1994.

SOUZA, F. M.; OLIVEIRA, A. C. Uso de diluidores alternativos para o sêmen de capote (Numida meleagris). In: REUNIÃO DE INICIAÇÃO À PESQUISA DA UECE, 1., 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UECE, p. 36-37, 1996.

TONIOLLI, R. Estudos das características "in vitro" do sêmen caprino de raças nativas do Nordeste brasileiro diluído em água de coco sob a forma "in natura", estabilizada e de gel. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, p. 209-220, 1989a.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M.I.; CAVALCANTE, S.G. Avaliação in vitro do sêmen suíno em BTS e na água de coco in natura e estabilizada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.4, p. 198-201, 1998.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D. S. M. Fertility of sows inseminated with diluted semen in coconut water or B.T.S. extender. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 14, p. 249-54, 1990.

TOURNAYE, H. Male factor infertility and ART. **Asian Journal of Andrology**, v. 14,

p. 103-8, 2012. doi: 10.1038/aja.2011.65

UCHÔA, D. C.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Artificial insemination with fresh semen in female Boxers using different extenders. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p. 150-152, 2002.

UCHÔA, D. C. **Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluentes à base de água de coco**. Fortaleza, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-79, 2002.

VIGLIAR, R.; SDEPANIAN, V. L.; FAGUNDES-NETO, U. Perfil bioquímico da água de coco. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 308-12, 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.2223/JPED.1508>

VOLPES, A. *et al.* The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v. 33, p. 765-70, 2016. doi: 10.1007/s10815-016-0696-2

ZANEVELD, L. J. D.; SCHUMACHER, G. F. B. **Reproducción Humana**. Barcelona: Salvat, 1986. p. 123.

**ANEXOS**

## ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo

02/04/2017

ScholarOne Manuscripts



Navigation menu for ScholarOne Manuscripts. The menu is dark grey with white text. It includes a hamburger menu icon, the journal title "Reproduction, Fertility and Development", and three main navigation items: "Home" (with a house icon), "Author" (with a pencil icon and highlighted in orange), and "Review" (with a magnifying glass icon).

## Submission Confirmation



Thank you for your submission

**Submitted to**  
Reproduction, Fertility and Development

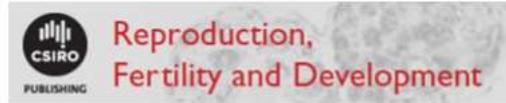
**Manuscript ID**  
RD17138

**Title**  
Use of powdered coconut water in the dilution and preparation of spermatozoa used in assisted human reproduction techniques

**Authors**  
Souza, Ivon  
Mesquita, Francisco José  
Silveira, Erika  
Teixeira, Gabriela  
Gomes, Larissa  
Rocha, Hermano Alexandre  
Nunes, José  
Sales, Antonia  
Salgueiro, Cristiane

**Date Submitted**  
03-Apr-2017

---

**Reproduction, Fertility and Development**


**Use of powdered coconut water in the dilution and preparation of spermatozoa used in assisted human reproduction techniques**

Journal:	<i>Reproduction, Fertility and Development</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Souza, Ivon; Universidade Estadual do Ceara, Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Mesquita, Francisco José; Universidade Estadual do Ceara, Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Silveira, Erika; Centro de Medicina Integrada de Sergipe Teixeira, Gabriela; Universidade de Fortaleza, Medicina Course Gomes, Larissa Rocha, Hermano Alexandre; Centro Universitário Unichristus Nunes, José; Universidade Estadual do Ceara, Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Sales, Antonia; Universidade Estadual do Ceara, Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Salgueiro, Cristiane; Universidade Estadual do Ceara, Biotechnology Integrated Nucleus ; ACP Biotecnologia, Research, Development and Innovation
Keyword:	assisted reproductive technology, in vitro fertilisation, spermatozoa, cell culture